

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2010. 09. 016

乳腺癌组织中 Livin mRNA 与 Smac 蛋白的表达

潘 峥¹,陈 军²,覃冠德¹,覃思繁²

Expression of Livin mRNA and Smac in Breast Cancer

PAN Zheng¹,CHEN Jun², QIN Guan-de¹,QIN Si-fan²

1. Department of Internal Medicine, Maternity and Children Health Care Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530003, China; 2. Department of Pathology, The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University

Abstract: Objective To investigate the expression of Livin mRNA and Smac protein in breast cancer and their correlations with metastasis and recurrence. **Methods** The expression of Livin mRNA was investigated by reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) in 50 breast carcinomas and paired adjacent breast tissues. The expression of Smac protein in the same cases was detected by immunohistochemistry (IHC). **Results** Livin mRNA was over expressed in breast cancers compared with paired adjacent breast tissues and Smac protein was significantly lower that compared with that expressed in paired adjacent breast tissues. The expressions of Livin mRNA was significantly correlated with the TNM stage, axillary lymph node metastasis, the recurrence of tumor and the express of C-erbB-2. The protein expression of Smac was significantly correlated with histological grade, the TNM stage, axillary lymph node metastasis, the recurrence of tumor and the express of C-erbB-2. There was a significantly negative relationship of Livin with Smac. **Conclusions** The inactivation of Smac protein and overexpression of Livin mRNA might enhance the tumor cell proliferation and malignance, and might play an important role in the occurrence and development of human breast cancer.

Key words: Breast cancer; Livin mRNA; Smac; RT-PCR; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨凋亡抑制因子 Livin mRNA 和凋亡促进因子 Smac 蛋白在人乳腺癌的表达及相关性,分析其与乳腺癌转移复发的关系。**方法** 收集 50 例乳腺癌和相应的癌旁组织,应用逆转录聚合酶链反应技术和免疫组织化学法检测组织中 Livin mRNA 与 Smac 的表达水平。**结果** 50 例乳腺癌组织中 Livin mRNA 表达的阳性率显著高于相应的癌旁组织($P=0.000$),癌组织中 Smac 表达的率显著低于癌旁组织($P=0.008$)。Livin mRNA 的表达与 TNM 分期、腋窝淋巴结转移、术后复发及 C-erbB-2 表达密切相关($P<0.05$)。Smac 的表达与 TNM 分期、组织学分级、腋窝淋巴结转移、术后复发及 C-erbB-2 密切相关($P<0.05$)。Livin mRNA 和 Smac 的表达有显著负相关性($\gamma=-0.357, P=0.011$)。**结论** Livin mRNA 的高表达及 Smac 的失活可能在乳腺癌的发生及进展中起着重要作用。

关键词: 乳腺癌; Livin mRNA; Smac; 逆转录聚合酶链反应; 免疫组织化学

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)09-1035-05

0 引言

肿瘤的发生是细胞增殖与凋亡失衡所致,凋亡抑制是肿瘤发生的重要机制。Livin 是凋亡抑制细胞蛋白(IAP)家族的新成员,在大多数恶性肿瘤中高表达,起到抑制细胞凋亡的作用^[1]。而第二个线

粒体源的 Caspases 激活物(second mitochondrial activator of Caspases, Smac)是新近发现的线粒体膜间隙蛋白,可释放到胞质中促进凋亡的发生^[2]。我们检测乳腺癌组织中 Livin mRNA 和 Smac 蛋白表达情况,并对它们的临床病理特征进行分析,探讨两者与乳腺癌发生、发展的关系。

收稿日期:2009-06-11;修回日期:2010-01-08
作者单位:1. 530003 南宁,广西壮族自治区妇幼保健院内科;2. 广西医科大学附属肿瘤医院病理科
作者简介:潘峥(1977-),女,学士,主治医师,主要从事妇科肿瘤的内科治疗研究

1 资料与方法

1.1 资料来源

收集 2002 年 1 月—2003 年 8 月广西医科大学

附属肿瘤医院手术切除的乳腺癌标本 50 例,年龄 28~72 岁,中位年龄 45 岁;患者术前均未进行任何抗癌治疗,每例均取癌及对应癌旁组织(距肿瘤边缘 2~5cm)。手术切下后一部分迅速放入液氮冷冻,再移至-80℃冰箱冻存。另一部分立即放入 10%中性福尔马林溶液内固定后石蜡包埋,用于 HE 染色及免疫组织化学染色。所有病例随访 5 年,按 UICC 2003 年 TNM 分期,根据 Patley 和 Scarff 方法进行组织学分级。

1.2 主要试剂与仪器

TRIzol 总 RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒及 DNA 聚合酶为立陶宛 MBI 公司。Smac 鼠抗人单克隆抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司,抗体稀释浓度为 1:100,即用型快捷 Maxvision™ 检测试剂盒购自福州迈新生物技术科技公司。PCR 仪为美国 Thermo 公司产品;凝胶电泳成像系统为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 检测

(1) 总 RNA 提取及 cDNA 合成 用 TRIzol 试剂提取总 RNA,按说明书进行,并用紫外分光光度计定量、测纯度(A260/A280 值均≥1.8)。cDNA 合成按说明书进行。

(2) 引物设计及合成 根据 Primer 5.0 软件设计引物,Livin 的上游引物为:5'-TGACCTG-GAGAGAGGACCCA-3',下游引物为 5'-GTCCAG-GACAGGCAGA GAGG-3';扩增产物为两种片段:α 亚型(357bp)和 β 亚型(303bp)。内参照 GAPDH 引物序列:上游引物为 5'-TCATTGACCTCAACTA-CATG -3',下游引物为 5'-GCAGTGATGGCATG-GACTGT -3',PCR 产物长度为 437bp。所有引物由上海生物工程有限公司合成。

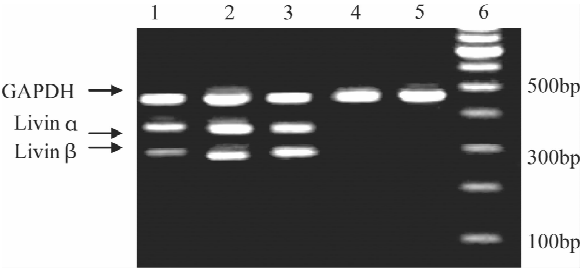
(3) PCR 反应 50μl 反应总体积:包括 cD-NA4μl,20μmol/L 上、下游引物各 0.5μl,2mmol/L dNTP 5μl,10×PCR 反应缓冲液 5μl,25mmol/L MgCl 24μl,5u/μl Taq DNA 聚合酶 0.4μl,其余以 DEPC 水补足至 50μl。反应条件为:94℃ 预变性 5min;94℃ 45s,60℃ 45s,72℃ 1 min,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。

1.3.2 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 免疫组织化学检查采用 SP 二步法。整个过程按试剂盒说明书进行。每批染色均设已知阳性切片作阳性对照,用磷酸盐缓冲液(phosphatic buffered saline,PBS)代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

1.4.1 PCR 产物的阳性判定 取 5μl PCR 扩增产

物,上样于 2%琼脂糖凝胶上电泳,溴乙锭显色,自动电泳凝胶成像分析系统扫描分析,以 Livin 基因与 GAPDH 在相应扩增条带处同时有表达为阳性,见图 1。



1,2,3:breast carcinomas;4,5:adjacent breast tissues; 6:DNA marker

图 1 Livin mRNA RT-PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 The electrophoregram of Livin mRNA RT-PCR product

1.4.2 免疫组织化学检测的阳性判定 Smac 的阳性表达以细胞质出现棕褐色颗粒为准,见图 2。由两位医师采用双盲法观察每张切片。阳性判断参照许良中等的报道^[3]:首先按切片中癌细胞染色强度计分:0 分无显色;1 分淡黄色;2 分棕黄色;3 分棕褐色;再按切片中阳性癌细胞数所占百分比打分:0 分为阴性,1 分为阳性癌细胞≤10%;2 分为 11%~50%,3 分为 51%~75%,4 分为>75%。染色强度与阳性细胞百分比的乘积>3 分计为阳性。

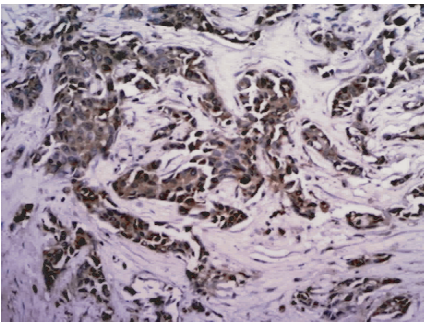


图 2 乳腺癌组织中 Smac 蛋白阳性表达(SP ×100)

Figure 2 Expression of Smac protein in breast carcinomas (SP ×100)

1.5 统计学方法

统计学处理采用 SPSS11.0 软件进行 χ^2 检验,Spearman 相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Livin mRNA 在乳腺癌及癌旁组织中的表达

50 例乳腺癌组织中 Livin mRNA 阳性表达率为 64.0%(32/50),见图 1。Livin α mRNA(56.0%)略高于 Livin β mRNA(50.0%),但差异无统计学意义($P>0.05$)。在癌旁组织中,Livin mRNA 阳性表达率为 24.0%(12/50),见图 1。乳腺癌组织与癌

旁组织的 Livin mRNA 表达差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。癌组织中 Livin mRNA 阳性表达在 TNM 不同分期、腋窝淋巴结是否转移、术后复发及 C-erbB-2 表达状态等不同分组间比较差异有统计学意义($P<0.05$);而在月经状况、不同组织学分级、肿瘤大小、雌激素受体及孕激素受体状态不同分组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.2 Smac 蛋白在乳腺癌及癌旁组织中的表达

50 例乳腺癌组织及癌旁组织中 Smac 蛋白阳性表达率分别为 60.0%(30/50)和 84.0%(42/50),见图 2,两组间差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。癌组织中 Smac 蛋白阳性表达在 TNM 不同分期、

不同组织学分级、腋窝淋巴结是否转移、术后复发及 C-erbB-2 表达状态等不同分组间比较差异有统计学意义($P<0.05$);而在月经状况、肿瘤大小、雌激素受体及孕激素受体状态不同分组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.3 乳腺癌组织中 Livin mRNA 表达与 Smac 蛋白表达的关系

18 例 Livin mRNA 表达阴性的标本中有 15 例 Smac 蛋白表达阳性(83.89%),30 例 Smac 表达阳性的标本中 15 例 Livin mRNA 表达阴性(50.0%),经分析 Livin 和 Smac 蛋白表达在乳腺癌组织中表达呈显著负相关,见表 3。

表 1 乳腺癌组织及癌旁组织中 Livin mRNA 和 Smac 蛋白的表达

Table 1 The expression of Livin mRNA and Smac protein in breast carcinomas and paired adjacent breast tissues									
Groups	n	Livin mRNA		χ^2	P	Smac protein		χ^2	P
		+	-			+	-		
Breast carcinoma	50	32	18			30	20		
Adjacent breast tissues	50	12	38	16.234	0.000	42	8	7.143	0.008

表 2 Livin mRNA 和 Smac 蛋白表达与乳腺癌临床病理特征的关系

Table 2 The relations of Livin mRNA and Smac protein expression with clinicopathologic feature of breast cancer									
Clinicopathologic feature	n	Livin mRNA		χ^2	P	Smac protein		χ^2	P
		+	-			+	-		
Status of menses									
Premenopausal	22	13	9			12	10		
Postmenopausal	28	19	9	0.411	0.522	18	10	0.487	0.485
TNM stages									
I ~ II	30	15	15			22	8		
III	20	17	3	6.380	0.012	8	12	5.556	0.018
Histological grade									
I ~ II	23	12	11			18	5		
III	27	20	7	2.585	0.108	12	15	5.918	0.015
Tumor size									
≤2cm	17	9	8			13	4		
>2cm	33	23	10	1.367	0.242	17	16	2.912	0.088
Axillary lymph node metastasis									
Positive	26	21	5			11	15		
Negative	24	11	13	6.611	0.010	19	5	7.065	0.008
Recurrence of tumor									
Recurrence	19	16	3			7	12		
None recurrence	31	16	15	5.433	0.020	23	8	6.848	0.009
ER									
Postitive	32	22	10			20	12		
Negative	18	10	8	0.871	0.351	10	8	0.232	0.630
PR									
Positive	30	18	12			16	14		
Negative	20	14	6	0.521	0.471	15	5	2.391	0.122
C-erbB-2									
Positive	21	17	4			9	12		
Negative	29	15	14	4.516	0.034	21	8	4.434	0.035

表 3 乳腺癌组织中 Livin mRNA 和 Smac 蛋白表达的关系

Table 2 The relations of Livin mRNA and Smac protein expression in breast carcinomas

Livin mRNA	Smac protein		合计
	Negative	Positive	
Negative	3	15	18
Positive	17	15	32
Total	20	30	50

Note: $\gamma = -0.357$; $P = 0.011$

3 讨论

Livin 是新近发现的一个 IAPS 家族成员,位于人染色体 20q13.3,全长 46kb,包含 7 个外显子及 6 个内含子^[2]。Ashhab 等^[4]通过 RT-PCR 证明 Livin 转录产物按剪接方式不同有两种 mRNA 亚型即 Livin α 和 Livin β ,分别编码 298 和 280 个氨基酸的蛋白质。Livin 因其具有抗凋亡作用而成为肿瘤发生机制的研究热点。我们的研究表明,Livin 在乳腺癌组织中的阳性表达与癌旁组织比较差异有统计学意义,与 Hariu 等^[5]研究结果一致,提示 Livin 在乳腺癌的发生中可能起到一定作用。Irena 等^[6]在研究中发现,Livin β 在人子宫腺癌传代细胞系(HeLa cells)中呈高表达,而 Livin α 则不然,提示 Livin β 在 HeLa 细胞凋亡中起着重要作用。我们的研究结果是 Livin 两种异构体在乳腺癌的表达中并不存在差别,两者可能共同作用于乳腺癌的发生与发展。Gazzaniga 等^[7]报道 Livin 基因(主要是 Livin α)在膀胱癌过表达,其与膀胱癌的复发有着明显的关系,提示预后不良。我们的研究显示 Livin mRNA 的表达与 TNM 不同分期、腋窝淋巴结是否转移、术后复发及 C-erbB-2 表达状态等因素密切相关,提示了其在乳腺癌的进展中起着重要作用,其过表达亦预示预后不良。

Smac 基因位于人 12 号染色体长臂,由 7 个外显子组成,全长 1.5kb,它可激活 Caspase,从而促进凋亡的发生^[2]。Smac 在不同组织表达各不相同:在成人的睾丸表达水平最高,在心脏、肝脏、肾脏等也有较高的表达,在脑、肺脏、胸腺以及在外周血中为低表达^[8]。文献报道在不同的肿瘤组织中其表达不同,但低表达 Smac 可能抑制细胞凋亡,引起肿瘤的发生。Yoichi 等^[9]研究表明,在肾细胞癌中 Smac 表达比同源正常肾脏低,且表达与肾细胞癌的等级呈负相关;术后随访 5 年发现表达 Smac 的肾细胞癌患者其术后生存时间比不表达的要长。我们的研究结果亦得到了类似结论,Smac 在乳腺癌中的表达与组织学分级呈正相关,与 TNM 分期、腋窝淋巴

结转移、术后复发及 C-erbB-2 表达状态等呈负相关。以上结果提示,低表达 Smac 可使细胞凋亡减少,从而导致凋亡与增生失衡,癌细胞生长加快,参与了乳腺癌的发生与进展,但其具体机制还有待进一步阐明。

Ma 等^[10]研究显示 Livin 能通过 BIR 结构与 Smac 结合,促进 Smac 经泛素-蛋白酶途径降解,降低 Smac 表达水平,抑制细胞凋亡。故从理论上说两者应该是相互拮抗的负相关关系。但事实却非如此,陈晓等^[11]在非小细胞肺癌的研究显示,两者是正相关关系($\gamma = 0.455$),认为细胞凋亡活性可能会随着细胞增殖活性的增强而增强。而王慧敏等^[12]在研究 Livin 和 Smac 在 T 细胞淋巴瘤的表达结果显示两者为负相关关系($\gamma = -0.385$)。我们的研究结果显示,在乳腺癌中两者的表达呈负相关,提示两者的基因表达在乳腺癌中确实存在负反馈调节或存在相互拮抗的关系。Smac 表达减少直接或间接引起 Livin 的表达升高,减少细胞凋亡,或者从另一角度说,由于 Livin 或其他 IAP 家族成员的过表达,抑制 Smac 从线粒体释放,抑制了细胞凋亡,从而促进肿瘤的发生、发展和恶性增殖。值得注意的是我们的结果表明两者仅是弱的负相关($\gamma = -0.357$),可能有更多因素参与了两者的对细胞凋亡的调节,两者并非单纯的一对一的调节关系。

总之,Livin 的高表达及 Smac 的低表达在乳腺癌的发生及发展起了重要的作用。联合检测两者在乳腺癌中的表达,有助于评价乳腺癌的预后,并为乳腺癌的基因靶向治疗提供了新的途径。

参考文献:

[1] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J Biol Chem, 2001, 102(1): 3238-3246.

[2] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1): 33-42.

[3] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229-231.

[4] Ashhab Y, Alian A, Polliack A, et al. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern[J]. FEBS Lett, 2001, 495(4): 56-59.

[5] Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor or apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3): 1000-1009.

[6] Crnković-Mertens I, Semzow J, Hoppe-Seyler F, et al. Isoform-specific silencing of Livin gene by RNA interference defines Livin β as key mediator of apoptosis inhibition in HeLa cells[J]. J Mol Med, 2006, 84(3): 232-240.

[7] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, et al. Expression and prognostic significance of Livin, Survivin and other apoptosis

related genes in the progression of superficial bladder cancer [J]. *Ann Oncol*,2003,14(1):85-90.

[8] Chai J, Du C, Wu JW, et al. Structure and Biochemical Basis of Apoptotic Activation by Smac/DIABLO[J]. *Nature*,2000, 406(6798):855-862.

[9] Yoichi M, Hiroyuki N, Kosuke Y, et al. Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance[J]. *Am J Clin Oncol*,2005,23(3):448-454.

[10] Ma L, Huang Y, Song Z, et al. Livin promotes Smac/DIAB-

LO degradation by ubiquitin-proteasome pathway [J]. *Cell Death Differ*,2006,13(12):2079-2088.

[11] 陈晓,杨春鹿,赵君,等. 非小细胞肺癌组织 Livin 和 Smac 蛋白表达及其临床意义的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*,2008,15 (12):905-909.

[12] 王慧敏,顾康生,孟刚. Livin 和 Smac 在 T 细胞淋巴瘤中的表达及意义[J]. *临床肿瘤学杂志*,2008,13(7):603-606.

[编辑:安 凤;校对:周永红]

(上接第 1034 页)

参考文献:

[1] Ulrich CM, Robien K, McLeod HL. Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12): 912-920.

[2] Chung CH, Bernard PS, Perou CM, et al. Molecular portraits and the family tree of cancer [J]. *Nat Genet*, 2002, 32 (Suppl): 533-540.

[3] Michor F, Iwasa Y, Nowak MA. Dynamics of cancer progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004,4(3):197-205.

[4] Simon R, Nocito A, Hübscher T, et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001,93(15):1141-1146.

[5] Guarneri V, Giovannelli S, Ficarra G, et al. Comparison of HER-2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management [J]. *Oncologist*, 2008,13(8):838-844.

[6] Hermeking H. The MYC oncogene as a cancer drug target [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003,3(3):163-175.

[7] Dawood S, Resetkova E, Gonzalez-Angulo AM. Trastuzumab administration associated with change in HER2 status [J]. *Clin Breast Cancer*, 2008,8(4):366-369.

[8] Gong Y, Booser DJ, Sneige N. Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2005,103(9):1763-1769.

[9] Neubauer H, Gall C, Vogel U,et al. Changes in tumour biological markers during primary systemic chemotherapy (PST) [J]. *Anticancer Res*, 2008,28(3B):1797-1804.

[10] Meng S, Tripathy D, Shete S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004,101(25):9393-9398.

[11] V. 2. 2008. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast Cancer[S].

[12] Arens N, Bleyl U, Hildenbrand R. HER2/neu, p53, Ki67, and hormone receptors do not change during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [J]. *Virchows Arch*, 2005,446 (5):489-496.

[13] Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *J Clin Oncol*, 2005,23(11):2469-2476.

[14] Regitnig P, Schippinger W, Lindbauer M, et al. Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas[J]. *J Pathol*, 2004,203(4):918-926.

[15] Santinelli A, Pisa E, Stramazotti D,et al. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy [J]. *Int J Cancer*, 2008,122(5):999-1004.

[编辑:杨 卉;校对:周永红]